

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871069

研究課題名(和文) 液状検体を用いた唾液腺癌の診断および予後因子の検討

研究課題名(英文) Liquid based cytology method investigation of definite cytology diagnosis on salivary gland carcinoma and analysis of prognostic factor

研究代表者

佐藤 由紀子(Sato, Yukiko)

公益財団法人がん研究会・有明病院 病理部・医員

研究者番号：30365712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、唾液腺腫瘍(SGT)において細胞診で組織型を確定することで治療選択、予後を改善することにある。近年、SGTは組織型により治療戦略を変更している。SGTは耳下腺発生が多く、一般的に術前診断には細胞診が用いられるが、組織型確定は困難である。形態的に核異型が弱く、類似する組織型の多い腺様嚢胞癌(ACC)ではMYB, MYBL1, NF1Bの検討が有用であった。FISH法は一般的にパラフィン切片で実施するが、組織型に特異的な融合遺伝子の検出が細胞診で可能か検討し発表した。我々は、ACCの細胞診において生検の負担の軽減、治療戦略の点から、FISH法が極めて有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to bring treatment option and improve prognosis by definitive cytologic diagnosis on histologic subtype in salivary gland tumor(SGT). SGT treatment has recently changing strategy by histologic subtype. SGT which has large number of parotid gland onset, is difficult to establish tissue type on preoperative diagnosis which generally uses fine needle aspiration cytology. Adenoid cystic carcinoma, which has analogue of histologic type and negative on nuclear atypia, was effective on examination of FISH method, MYB, MYBL1 and NF1B. FISH was generally conducted by formalin fixed paraffin embedded tissue. we have examined the feasibility of cytology to detect specific fusion gene by each histologic type and announced results on conference presentation. We found cytologic diagnosis extremely valuable on FISH method of adenoid cystic carcinoma which brings less burden on biopsy and more accuracy on treatment strategy.

研究分野：人体病理

キーワード：LBC FISH 唾液腺腫瘍 MYB NF1B MYBL1

1. 研究開始当初の背景

a. 従来の唾液腺癌の治療の問題点

唾液腺癌の治療は手術切除が第1選択で、術後に補助的な治療(放射線治療、化学療法)が行われるのが一般的である。しかし、唾液腺癌に対する化学療法はあまり有効性が示されておらず、組織型別の奏効率は不明で、有用な悪性度分類も確立していない。手術不能な場合には、穿刺吸引細胞診断にて腺癌の診断のもと、組織型を区別することなく化学療法が施行されてきた。しかし、近年、新たに分子標的薬の有効性が検討され始めていることから、術前診断は非常に重要な意味を持ち、組織型に基づいた化学療法薬の選択が可能となりつつある。

b. HER2 陽性唾液腺癌の分子標的治療

研究代表者は国際福祉医療大学三田病院の多田雄一郎先生を中心とする他施設共同研究に加わり、頭頸部癌学会や唾液腺学会にて唾液腺導管癌の臨床病理学的な特徴を学会発表してきた(2012年)。

術後病理組織検体にて唾液腺導管癌と診断されると HER2 の免疫組織化学染色の検討を行い、それを標的とした分子標的治療を施行する機会が得られる。国内で集積された唾液腺導管癌は約 150 例に及び、長尾俊孝教授(東京医科大学病理診断部)とともに病理見直しを行い、唾液腺導管癌の悪性度分類の検討を行っていた。唾液腺導管癌と診断され HER2 抗体で 2+,3+となった症例に対しては FISH が実施され、治療が試みられている。

c. 融合遺伝子による唾液腺癌の分類の意義

腫瘍内部の異型度が一様でない腫瘍が多く存在し、時に低悪性癌と高悪性癌が混在することがある。低分化癌から悪性度の高い癌の発生する現象を唾液腺において脱分化と称し、近年確立されつつある概念である(Cheuk W, 1999.)。例えば、通常型の長期経過を経て腺様嚢癌では肺転移、肝転移と進行するのに対し、高悪性癌が生ずると早期にリンパ節転移が生じ、臨床病理学的特徴が変わる。場合によっては、腫瘍が高悪性成分に全て置き換わってしまうことが予想される。

この様に形態的分類が困難な場合が少なくないことから、近年明らかとなってきた融合遺伝子により腫瘍を分類することが有用であると考えられる。申請者の属する病理部が共同研究者として参画している ALK 肺癌プロジェクトでは、肺癌の 5-7% に EML4-ALK 融合遺伝子が見つかり(Nature. 448; 561,2007) 通常癌における融合遺伝子の重要性が、再認識されてきた。図に唾液腺腫瘍で見ついている融合遺伝子を示す(図1)。

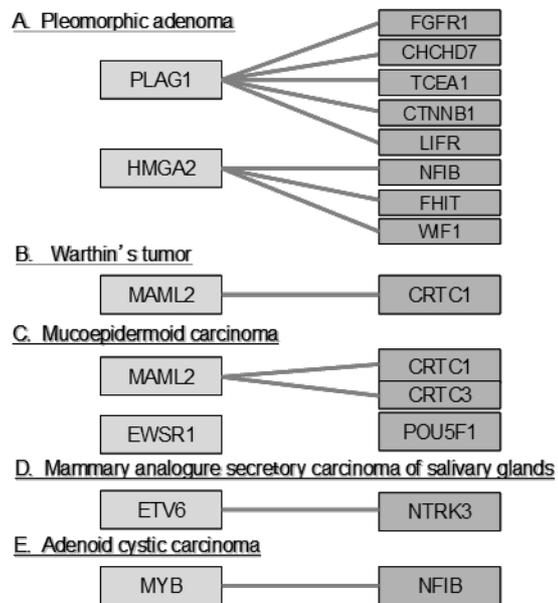


図1. 唾液腺腫瘍における融合遺伝子

2. 研究の目的

婦人科領域では一般的となった液状化検体を用い、唾液腺腫瘍の形態観察、免疫組織化学染色、融合遺伝子の発現解析を行い、組織型を確定することが可能かどうかを検討することを目的とした。

唾液腺癌は耳下腺発生が多く生検が困難であることから術前診断が難しく、治療戦略を立てにくかった。また、転移性/再発性唾液腺癌については化学療法の有効性が示されてこなかった。しかし、近年 HER2 陽性の唾液腺癌に関しては、術後補助療法として HER2 を標的とした治療の併用の有効性が示されつつある。HER2 陽性の唾液腺癌は唾液腺導管癌を代表とする高悪性癌であり、切除不能な場合が少なくない。また、腺様嚢癌の場合には、肺転移が既に見つかっていても、組織型が確定されればある程度の予後が見込めるために、原発切除の可能性が出てくる。したがって、生検の負担を軽減できる穿刺吸引細胞診にて組織型を確定することが治療戦略の上で重要な意味を持つ。そこで、我々は穿刺吸引細胞診にて組織型の確定可能かどうか検討する必要があると考える。

3. 研究の方法

- 1) 液状細胞診検体での形態観察と免疫組織化学染色を行う。
- 2) 唾液腺癌の手術材料(約 200 例)の TMA を作製、約 30 種類の融合遺伝子の FISH・DISH を行う。
- 3) 液状処理検体とパラフィン検体に対し RT-PCR にて融合遺伝子の発現を確認する。

最終的に全データを総括的に評価して、液状処理検体における唾液腺癌における融合遺伝子分類の有効性を検討し、診断精度を確認する。また、悪性度・予後との相関を解

明し、化学療法の有効性を確認する。

#### 4. 研究成果

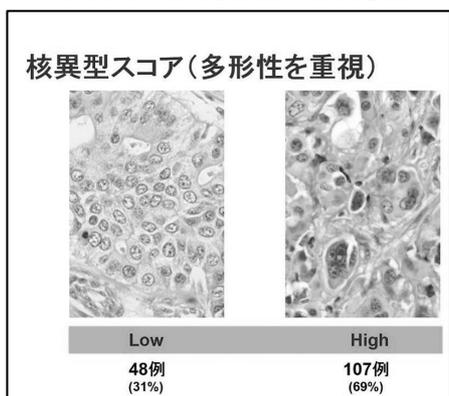
##### a. 唾液腺癌の治療の問題点について

唾液腺癌のなかで同じ組織型の中に低悪性度/高悪性度が分けられるものは、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺癌 NOS である。それ以外はすべてが同一の悪性度群に分類され、高悪性度群に対しては術後補助療法が推奨される。悪性度分類の存在する組織型については、単施設で口蓋の腺様嚢胞癌の組織学的悪性度と予後の関係を発表した<sup>1)</sup>、形態的な悪性度よりも発生部位が重要な意味を持った<sup>2)</sup>(小泉 2013 年)。

再発性/転移唾液腺癌の標準化学療法は確立されていないため、これまでの顎下腺癌の 32 年間の遠隔移例の carboplatin / paclitaxel を用いた化学療法の奏効率を検討したところ 43%であった<sup>3)</sup>(佐々木 2013 年)。その後組織型見直しを行い組織型別に奏効率をはじめて報告した<sup>4)</sup>(Nakano 2016 年)。結果として腺様嚢胞癌の場合には治療反応は乏しいが、無増悪生存率と全生存率に影響を及ぼさなかった。これは形態学的な診断のみで解析を行っているが、分類できなかった癌の中に高悪性転化の腺様嚢胞癌が含まれている可能性があり、今後 FISH 法を含めた検討を進めたいと考える。

##### b. HER2 陽性唾液腺癌の治療

高悪性度群に分類される唾液腺導管癌 (SDC) は HER2 陽性を示し、治療標的を有する癌である。組織学的な悪性度分類が存在しないが、補助療法の必要な予後の不良な群を抽出する必要がある。SDC は希少な癌であり、単施設では症例数が不十分なため多施設共同研究に参加し、組織学的悪性度分類の確立を目指して検討を行った。これまでに有用とされた静脈浸潤に加え、核異型度を分類することで、予後不良群を抽出できる可能性を示した<sup>5)</sup>(佐藤 2015 年)。臨床的な因子については共同研究者が論文発表した



(Otsuka 2016, Kawakita 2016)。

##### c. 融合遺伝子による分類について

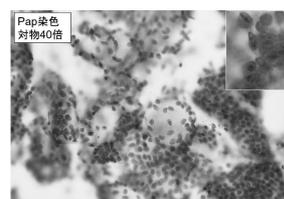
当院で切除された唾液腺癌について、TMA を作成して融合遺伝子について FISH 法を用いて網羅的解析を行った。脱灰処理により検索不可能であった例を除外し 98 例の検討を実施した。悪性度の異なる成分はそれぞれから作成した。それらの結果を踏まえ、年間 30 例程度の実臨床検体に FISH 法を施行し、診断に役立ててきた。結果はこれまでの報告どおり粘表皮癌に *MAML2* 2/7 (29%)、(乳腺相似) 分泌癌には *ETV6* 5/10 (50%) を検出した。腺様嚢胞癌については *MYB* 12/31 (39%)、*NFIB* 13/31 (42%) 変異を確認したが、2016 年のはじめに *MYBL1* が報告され追加して検討したところ *NFIB* のみの変異の例に 5/31 (16%) 陽性が確認された。*MYB* 変異があるにも関わらず *NFIB* との融合が陰性であった例については、共同研究をすすめている研究者がその異常を解析して発表した<sup>6)</sup>(富樫 2016 年)。

形態での診断時の組織型と一致しない融合遺伝子が発見された少数例については、発表を行ってきた。口蓋の淡明細胞癌の *EWSR1* 変異<sup>7)</sup>(佐藤 2014 年)、副鼻腔の低悪性度非腸型腺癌の *ETV6 - NTRK3*<sup>8)</sup>(佐藤 2015 年)、気管の淡明細胞癌の *EWSR1-ATF1*<sup>9)</sup>(武藤 2016 年、高松 2016 年)などを発表してきた。また、唾液腺腫瘍と共通の形態的特徴を有する歯源性淡明細胞癌の *EWSR1-ATF1*<sup>10)</sup>(Kujiraoka 2017 年)を論文発表した。

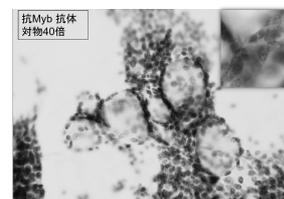
液状化検体の採取については、塗抹半径がやや広く、細胞数の割に面積が少なく観察不良であったため、捺印細胞診検体の採取に切り替えて実施した。

融合遺伝子の検索が治療戦略に大きく影響する腺様嚢胞癌に限って、捺印細胞診での FISH 法の検討を報告した<sup>11)</sup>(佐藤 2015)。

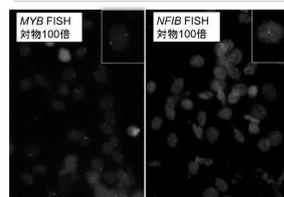
細胞診検体で腺様嚢胞癌が疑われる際の FISH 法を用いた診断の有性につき診



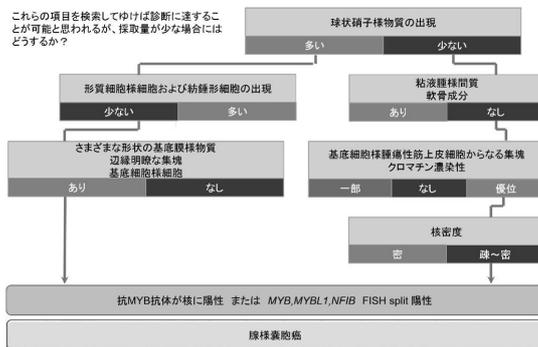
小型核でシート状に出現する集塊内にライトグリーン淡染性で球状の基底膜様物質が混在している。



基底細胞様腫瘍性筋上皮細胞の核に強く、びまん性に陽性を示します。



FISHのviableな癌細胞にはほぼすべてで、緑単独のシグナルが多数確認され、MYB、NFIB split 陽性という判断となる。



断のフローチャーを作成して、報告した(佐藤 2016年)。

FISH解析は、同病理部、分子標的病理プロジェクトの馬場郷子さん、坂田征二先生、竹内賢吾先生の協力のもとに行ってきた。

実臨床では、原発巣の生検時に高悪性転化がみられ、腺様嚢胞癌との診断が困難であった症例で化学放射線療法が施行され、後に肺の結節が出現し切除したところ通常型の腺様嚢胞癌の像で原発巣と共通の形態的特徴が見いだせなかった。融合遺伝子(MYB-NFIB)の検索により同一腫瘍という判断に至った症例があった。

この様に高悪性転化を示す部が必ずしも転移するとは限らないことから、診断名には腺様嚢胞癌と高悪性転化の両方が含まれる必要があると考えている。また、高悪性転化部が必ずしも転移するわけではなく、予後不良因子とはならないと考えられた。高悪性癌の診断の際には、融合遺伝子を用いた分類と悪性転化の有無を評価し、治療戦略に役立てることが可能であり、FISHは細胞診検体でも可能であり、侵襲を加えて生検をする必要性を減らせる可能性もある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

1. 佐々木 徹, 川端 一嘉, 佐藤由紀子 他. 唾液腺癌の診断と治療 up-to-date 顎下腺癌の治療. 頭頸部癌, 査読有, 39, 2013, 281-286.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjhn/39/3/39\\_281/\\_article/cited-by/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjhn/39/3/39_281/_article/cited-by/-char/ja/)
2. Otsuka K, Imanishi Y, Sato Y, et al. Clinical Outcomes and Prognostic Factors for Salivary Duct Carcinoma: A Multi-Institutional Analysis of 141

Patients. Annals of surgical oncology, 査読有, 23, 2016, 2038-2045.

DOI: 10.1245/s10434-015-5082-2

3. Nakano K, Sato Y, Sasaki T, et al. Combination chemotherapy of carboplatin and paclitaxel for advanced/metastatic salivary gland carcinoma patients: differences in responses by different pathological diagnoses. Acta oto-laryngologica, 査読有, 136, 2016, 948-951.  
DOI:10.3109/00016489.2016.1170876
4. 佐藤由紀子, 東山聖彦, 石川雄一. 肺癌II【新しい疾患】肺の筋上皮腫/筋上皮癌. 病理と臨床. 査読有. 34, 2016, 384-386.
5. Kawakita D, Tada Y, Sato Y, et al. Impact of hematological inflammatory markers on clinical outcome in patients with salivary duct carcinoma: a multi-institutional study in Japan. Oncotarget. 査読有, 2017, 1083-1091.  
DOI: 10.18632/oncotarget.13565
6. Kujiraoka S, Tsunematsu T, Sato Y, et al. Establishment and characterization of a clear cell odontogenic carcinoma cell line with EWSR1-ATF1 fusion gene. Oral Oncology. 査読有, 69, 2017, 46-55.  
DOI:10.1016/j.oraloncology.2017.04.003

[学会発表](計 23件)

1. 佐藤由紀子, 山本智理子, 福島啓文 他. 腺様嚢胞癌の術後 22 年に発生した鼻腔腺癌の 1 例. 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 7 日. 札幌.
2. 蛭名彩, 福島啓文, 佐藤由紀子 他. 全身転移を来した副咽頭間隙多形腺腫の 1 例. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会 2013 年 5 月 18 日. 札幌.
3. 小泉雄, 福島啓文, 佐藤由紀子 他. 硬口

- 蓋に発生した腺様嚢胞癌の治療経験。第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13 日。東京。
4. 元井紀子, 荒井祐司, 佐藤由紀子 他. 甲状腺穿刺吸引細胞診への液状化細胞診技術の応用. 第 54 回日本臨床細胞学会春期大会. 2013 年 6 月 1 日. 東京.
  5. 川島麻里沙, 佐藤由紀子, 池畑浩一 他. 耳下腺原発の Low grade cribriform cystadenocarcinoma の一例. 第 52 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2013 年 11 月 3 日, 大阪.
  6. 佐々木徹, 川端一嘉, 佐藤由紀子 他. 顎下腺癌の治療. 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13 日. 東京.
  7. 佐藤由紀子, 多田雄一郎, 川北大介 他. 唾液腺導管癌における病理学的予後因子の検討 多施設共同研究 . 第 57 回日本唾液腺学会 2013 年 12 月 1 日. 東京.
  8. 佐藤由紀子, 竹内賢吾, 新橋涉 他. *EWSR1* の転座を有する口蓋の hyalinizing clear cell carcinoma の 1 例. 第 60 回日本病理学会秋期特別大会. 2014 年 11 月 20 日. 沖縄.
  9. 伊藤崇彦, 佐藤由紀子, 古田則行 他. 耳下腺 Nodular oncocytic hyperplasia の 1 例. 第 58 回日本臨床細胞学会秋期大会 2014 年 11 月 8 日, 山口.
  10. 佐藤由紀子, 山本智理子, 長尾俊孝 他. 唾液腺導管癌の悪性度評価. 第 104 回日本病理学会 2015 年 4 月 30 日. 名古屋.
  11. 佐藤由紀子, 池畑浩一, 石井脩平 他. 細胞診検体で *MYB, NFIB* 転座を検出した舌根部腺様嚢胞癌の 1 例. 第 56 回日本臨床細胞学会春期大会 2015 年 6 月 14 日, 島根.
  12. 金澤丈治, 福島啓文, 佐藤由紀子 他. 唾液腺導管癌の臨床病理学的検討. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会 2015 年 5 月 21 日, 東京.
  13. Kanazawa T, Fukushima H, Sato Y, et al. Epigenetic Inactivation and Signaling Pathway of Galanin Receptors in Parotid Carcinoma. 4<sup>th</sup> Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology. 2015 年 6 月 4 日, Kobe.
  14. 佐藤由紀子, 山本智理子, 川端一嘉 他. 耳下腺の硬化性多嚢胞性腺症の 1 例. 第 26 回日本臨床口腔病理学会. 2015 年 7 月 31 日, 北海道.
  15. 佐藤由紀子, 山本智理子, 福島啓文 他. *ETV6 NTRK3* 融合遺伝子を認めた上顎洞癌の 1 例: 乳腺相似分泌癌との異同は? 第 60 回日本唾液腺学会誌 2015 年 12 月 5 日, 東京.
  16. 大塚邦憲, 今西順久, 佐藤由紀子 他. 唾液腺導管癌の臨床成績と予後因子 多施設共同による 141 例の検討 . 第 60 回日本唾液腺学会 2015 年 12 月 5 日, 東京.
  17. 佐藤由紀子, 山本智理子, 榊原里江 他. 耳下腺原発の小細胞癌の 1 例. 第 105 回日本病理学会総会. 2016 年 5 月 13 日. 名古屋.
  18. 服部雅優, 新橋涉, 佐藤由紀子 他. 当科における中咽頭腺様嚢胞癌の検討. 第 40 回日本頭頸部癌学会 2016 年 6 月 10 日, 埼玉.
  19. 高松学, 星利良, 佐藤由紀子 他. 気管支原発硝子化明細胞癌の 1 例. 第 55 回日本臨床細胞学会秋期大会 2016 年 11 月 18 日, 大分.
  20. 佐藤由紀子, 石井脩平, 伊藤崇彦 他. *MYB, NFIB* の転座を有する腺様嚢胞癌における細胞診検体での FISH の有用性について. 第 55 回日本臨床細胞学会秋期大会 2016 年 11 月 19 日, 大分.
  21. 加納里志, 高瀬聡一郎, 佐藤由紀子 他. 唾液腺導管癌における免疫組織化学的発現解析 多施設共同による 152 症例の検討 . 第 10 回日本癌治療学会 2016 年 10

月 22 日, 神奈川.

22. 武藤 麻理子, 高松 学, 佐藤 由紀子 他.  
肺原発の稀な唾液腺型腫瘍 Hyalinizing  
clear cell carcinoma の 2 例. 第 57 回日  
本肺癌学会 2016 年 12 月 20 日, 福岡.
23. 富樫由紀, 土橋映仁, 佐藤由紀子 他. 腺  
様嚢胞癌における病因論的考察:組織病  
理学,分子生物学,バイオインフォマティ  
クスを用いた統合的解析による 101 例の  
検討. 第 61 回日本唾液腺学会 2016 年 12  
月 3 日, 東京

〔図書〕(計 1 件)

佐藤由紀子 他. 頭頸部腫瘍 I 唾液腺腫瘍  
文光堂(担当:共著, 範囲:唾液腺導管癌)  
2015 年 4 月  
〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 由紀子 (Sato, Yukiko)  
公益財団法人がん研究会有明病院病理部  
医員  
研究者番号: 30365712

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )